松毛虫性信息素的固相微萃取及质谱和触角电位分析

孔祥波[1]，赵莉蔺[2]，张　真[1,*]，王鸿斌[1]，柏芳华[3]，于国民[4]
(1. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所，国家林业局森林保护重点实验室，北京 100091；
2. 中国科学院动物研究所，北京 100101；3. 安徽省东至县金寺山林场，安徽东至 247200；
4. 内蒙古克什克腾旗林业局，内蒙古克什克腾旗 025350)

摘要：松毛虫性信息素成分在腺体中含量很低。本研究利用固相微萃取(SPME)技术近距离长时间采集单头云南松毛虫 *Dendrolimus houi* 处女雌蛾释放的性信息素成分，并进一步利用气相色谱-质谱(GC-MS)和气相色谱-触角电位联用(GC-EAD)技术分析 SPME 采集的性信息素成分。结果显示：在云南松毛虫处女雌蛾求偶召唤期间 SPME 聚乙二醇/二乙烯基苯(CAR/DVB)萃取头吸附了大量的反 5，顺 7-十二碳二烯醇(*E*5, *Z*7-12:OH)和反 5，顺 7-十二碳二烯乙酸酯(*E*5, *Z*7-12:OAc)成分及微量的反 5，顺 7-十二碳二烯醛(*E*5, *Z*7-12:Ald)成分，这 3 种腺体成分均能激起云南松毛虫雄虫触角电位反应。与溶剂浸提昆虫性信息素成分的方法比较，SPME 活体采样技术和 GC-MS 及 GC-EAD 分析方法联用研究昆虫的信息素成分具有采集的样品代表性强、样品量能满足色谱分析需要和无溶剂干扰等方面的优点。最后还着重讨论了 SPME 技术的应用价值、效果及实际应用中应该注意的一些问题。
关键词：云南松毛虫；性信息素；固相微萃取；气相色谱-质谱联用仪；气相色谱-触角电位联用仪
中图分类号：Q968　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2010)08-0857-07

Solid-phase microextraction of pheromone components of *Dendrolimus houi* (Lepidoptera: Lasiocampidae) and their characterization by gas chromatography-mass spectrometry and GC-electroantennographic detection

KONG Xiang-Bo[1], ZHAO Li-Lin[2], ZHANG Zhen[1,*], WANG Hong-Bin[1], BAI Fang-Hua[3], YU Guo-Min[4]
(1. Key Laboratory of Forest Protection of State Forestry Administration, Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 3. Jinsishan Forest Farm of Dongzhi County of Anhui Province, Dongzhi, Anhui 247200, China; 4. Forestry Bureau of Keshiketeng Banner of Inner Mongolia, Keshiketeng, Inner Mongolia 025350, China)

Abstract: With a close-range live specimen sampling technique based on solid-phase microextraction (SPME), the pheromone components of *Dendrolimus houi* virgin female moths during the calling period were collected in order to increase the quantities of pheromone components. The sample-loaded SPME fiber was introduced onto the gas chromatography (GC) coupled with mass spectrometry (MS) or electroantennographic detection (EAD), and the samples were analyzed under oven temperature program condition. The results indicated that large amounts of (5*E*, 7*Z*)-5, 7-dodecadien-1-ol (*E*5, *Z*7-12:OH) and (5*E*, 7*Z*)-5, 7-dodecadien-1-yl acetate (*E*5, *Z*7-12:OAc) were obtained by SPME CAR/DVB fiber, and trace amounts of (5*E*, 7*Z*)-5, 7-dodecadienal (*E*5, *Z*7-12:Ald) were also observed in the effluvia. The three compounds sampled by SPME fiber could evoke electroantennographic responses from male moth antennae. Compared with the pheromone gland extraction method with solvent, SPME sampling technique coupled with GC-MS and GC-EAD analysis has some advantages, such as representative sample collecting, relative large quantities of sample obtained, and solvent-free sample preparation technique, *etc*. Finally, the importance and practical aspects concerning the SPME are also discussed.
Key words: *Dendrolimus houi*; sex pheromone; SPME; GC-MS; GC-EAD

基金项目：国家自然科学基金项目(30300275；30771737)；创新方法工作专项项目(2008IM022000)
作者简介：孔祥波，男，1971 年生，山东人，副研究员，主要从事昆虫化学生态学研究，E-mail：xbkong@ sina. com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：zhangzhen@ caf. ac. cn
收稿日期 Received：2010-02-01；接受日期 Accepted：2010-06-17

物种特异性的性信息素化学通讯系统对蛾类昆虫种群繁衍和同地域近缘种之间的生殖隔离具有重要的生物学意义。研究物种特异性的性信息素成分及释放比例是化学生态学研究的重要内容。溶剂浸提昆虫性信息素腺体获取性信息素成分的方法在其结构鉴定工作中一直发挥着重要作用；特别是需要对待鉴定的成分进行各种化学衍生化反应时，溶剂浸提的方法显得尤为重要（孔祥波等，2004，2005b）。但是，由于雌虫在某一时间段能持续不断地释放性信息素成分，在其求偶召唤的某一时间点溶剂浸提的性信息素的量有时并不能满足各种色谱分析的需要，因此需要增加昆虫性信息素腺体的溶剂浸提数量以弥补不足。这又会造成提取的性信息素成分受杂质干扰、微量成分缺失或者成分发生转化等方面的缺点，所以探索新的性信息素制备方法显得非常必要。

固相微萃取（solid-phase microextraction，SPME）技术具有小样品量快速取样、灵敏度高、重复性好、无溶剂干扰、容易与各种分析仪器配套使用等优点，已经广泛应用于环境、食品、制药等方面的样品分析工作（Kataoka *et al.*，2000；Wardencki *et al.*，2004）。在化学生态学研究领域，SPME技术已经应用于昆虫信息素释放时辰节律（Malosse *et al.*，1995）、益他素分析（孔祥波等，2005a）和性信息素结构鉴定（Robacker *et al.*，2009）等方面。落叶松毛虫性信息素成分溶剂浸提和气相色谱分析时发现其性信息素成分的含量低于纳克数量级（Kong *et al.*，2007b）。另外，云南松毛虫利用*E*5，*Z*7-12:OAc及相应的醇和醛构成种内化学通讯系统，溶剂浸提的性信息素次要成分*E*5，*Z*7-12:Ald的含量也低于纳克数量级（Kong *et al.*，2007a）。松毛虫性信息素成分含量非常低的现象极大地制约了该属昆虫性信息素的结构鉴定工作。如何有效富集松毛虫性的性信息素成分，提高性信息素结构鉴定的简便性和可靠性，这对性信息素的制备技术提出了更高的要求。本研究利用SPME CAR/DVB萃取头对挥发性成分优异的吸附能力和DB-WAX毛细管色谱柱分离性信息素成分的高灵敏度和高分辨率，以云南松毛虫性信息素研究为例，采用SPME与GC-MS和GC-EAD分析技术联用，评价SPME技术在昆虫性信息素研究工作中的重要性。

1 材料与方法

1.1 实验昆虫

从云南省普洱市采集云南松毛虫虫茧带回实验室，在25±1℃，相对湿度60%～80%和光周期16L:8D条件下自然羽化。羽化的雌雄成虫立即分开，雌虫用于固相微萃取法收集性信息素成分，雄虫触角用于性信息素成分的触角电位分析。

1.2 松毛虫性信息素的固相微萃取过程

在上述室内条件下，4头云南松毛虫雌虫进入暗期2 h后，静止在铁纱网养虫笼壁上，此时有的雌虫处在求偶召唤状态。根据求偶召唤雌虫在养虫笼壁的位置，用支架将SPME手柄固定于适宜的高度和角度，SPME针头穿过养虫笼壁的铁纱网接近一头正在求偶召唤的雌虫性信息素腺体，推出CAR/DVB（70 μm，Supelco，Bellefonte，PA）萃取头，使其接近雌虫腺体1～2 mm，静态萃取雌虫腺体释放的性信息素成分3 h（图1）。然后缩回萃取头，含有性信息素成分的萃取头在GC进样器中热解析2 min，程序升温进行GC-MS和GC-EAD分析。进仪器分析前在含有性信息素成分的萃取头上直接滴加C18，C20，C21和C22正构烷烃混标1 μL，二氯甲烷配制的混标中每种正构烷烃的浓度均为16 ng/μL。

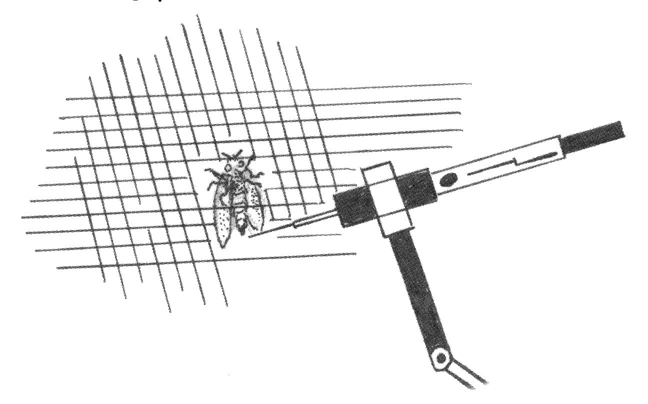


图1 云南松毛虫活雌蛾性信息素固相微萃取简图

Fig. 1 Pheromone sampling scheme with SPME from live virgin female *Dendrolimus houi*

1.3 GC-MS分析

SPME萃取的性信息素成分及标准品均在Finnigan Trace DSQ GC-MS上分析（EI mode，70 eV，无分流进样），质量扫描范围是41～460 amu。GC装有DB-WAX毛细管色谱柱（J&W Scientific，

Folsom, CA, USA, 30 m × 0.25 mm i. d. × 0.25 μm film thickness)；柱温：60℃（1 min）~ 240℃（10 min），升温速率 6℃/min；氦气做载气（1.0 mL/min），进样器、离子源和传输线温度分别为 220℃，250℃和 250℃。

1.4 GC-EAD 分析

SPME 萃取的性信息素成分及标准品在 HP6890 GC 上分析。GC 装有 DB-WAX 毛细管色谱柱（J&W Scientific, 30 m × 0.25 mm i. d. × 0.25 μm film thickness）、火焰离子化检测器（FID）和触角电位检测器（EAD）。GC 条件为：进样器和检测器温度均为 220℃；柱头压 15 psi，平均柱流速是46 cm/s；分流阀 0.75 min 后打开，分流流速是 37 mL/min。柱温：80℃（1 min）~ 220℃（10 min），升温速率 10℃/min。EAD 条件为：切掉端部 1 ~ 2 mm 的离体雄虫触角（1 ~ 3 日龄）直接用导电胶（Spectra 360 Electrode Gel, Parker Laboratories Inc. Orange, NJ, USA）连接在触角电位的记录电极和参比电极上，并置于湿润的空气流中（流速 500 mL/min）。毛细管色谱柱柱尾端装在 OSS-2 分流阀（SGE, Austrilia）上，流出色谱柱的性信息素成分经分流阀 1∶1 分流后分别由 2 根 40 cm 长的空毛细管色谱柱导到 FID 和 EAD 检测器检测。分流阀处加 10 mL/min 氮气作为补充气。采集的 EAD 信号经 AC/DC UN-6 放大器放大，IDAC 数据转换后，GC-EAD 软件进行数据采集分析（Syntech, The Netherlands）。

1.5 Kovάts 保留指数计算

根据 Marques 等（2000）描述的公式计算标准品和分析样品的 Kovάts 保留指数。

2 结果与分析

固相微萃取云南松毛虫性信息素腺体成分 3 h，经 DB-WAX 色谱柱分离，质谱分析发现在色谱保留时间 t_R 21.46 min 和 t_R 22.95 min 处的 2 个色谱峰“b”和“c”分别具有 2 061 和 2 156 的 Kovάts 保留指数。与标准品比较分析，初步判断这 2 个成分是 *E*5, *Z*7-12∶OAc 和 *E*5, *Z*7-12∶OH。另外，腺体成分“a”（t_R 18.52 min）的 Kovάts 保留指数是 1 886，与标准品比较分析，初步判断是 *E*5, *Z*7-12∶Ald（图 2）。

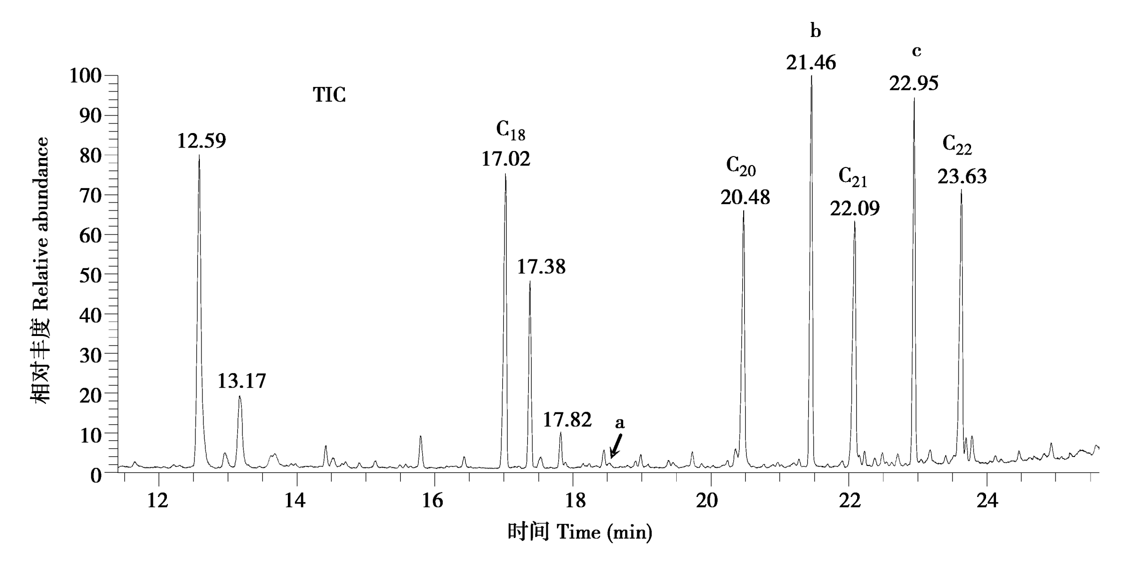


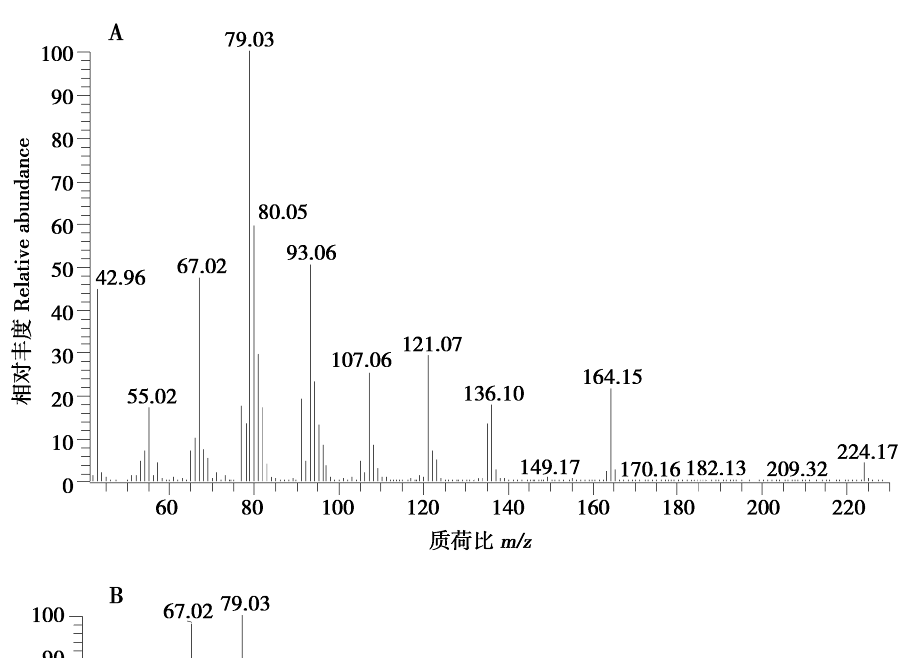
图 2　固相微萃取云南松毛虫性信息素腺体成分的总离子流色谱图

Fig. 2　The total ion chromatogram (TIC) of SPME-GC-MS analysis of calling female effluvia of *Dendrolimus houi*

a：反 5，顺 7-十二碳二烯醛 *E*5, *Z*7-12∶Ald；b：反 5，顺 7-十二碳二烯乙酸酯 *E*5, *Z*7-12∶OAc；c：反 5，顺 7-十二碳二烯醇 *E*5, *Z*7-12∶OH.

云南松毛虫性信息素腺体成分“b”和“c”的质谱图如图 3 所示。腺体成分“c”具有分子离子峰 M^+（*m/z* 182，3% ~ 4%），$[M-H_2O]^+$（*m/z* 164，15% ~ 20%）和一系列典型的特征碎片离子 $C_nH_{2n-2}^+$ ~ $C_nH_{2n-5}^+$。腺体成分“b”和腺体成分“c”有相似的特征碎片离子 $C_nH_{2n-2}^+$ ~ $C_nH_{2n-5}^+$，但是具有不同的分子离子峰 M^+（*m/z* 224，4% ~ 5%）和特征碎片离子 $[M-CH_3COOH]^+$（*m/z* 164，23% ~ 25%）。与标准品质谱图比较分析，发现腺体成分“c”是 5，7-十二碳二烯醇，腺体成分“b”是

5，7-十二碳二烯乙酸酯。共轭双键在碳链相同位置的 4 种立体异构体的质谱图非常相似，但是其在 DB-WAX 色谱柱上的色谱保留时间不同。与标准品的质谱图进一步比较分析，确认腺体成分“c”是 *E*5，*Z*7-12∶OH，腺体成分“b”是 *E*5，*Z*7-12∶OAc。在 t_R18.52 min 处(图 2)的腺体成分“a”的质谱图受其他杂质干扰，其特征碎片离子不是简单明了。但是发现了碎片离子 *m/z* 180(5%)，162(3%)，151(3%)，136(17%)，123(15%)和 79(100%)，其特征碎片相对丰度、色谱保留时间与标准品 *E*5，*Z*7-12∶Ald 一致。



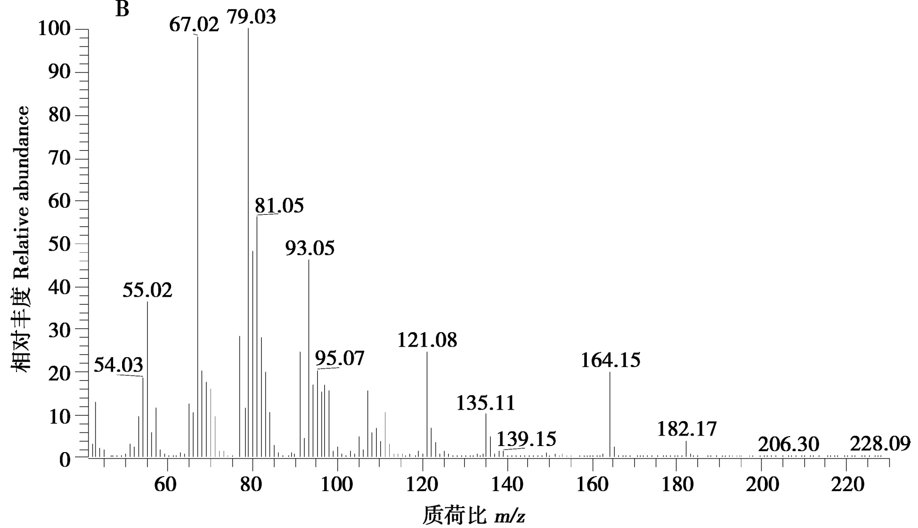


图 3 云南松毛虫性信息素腺体成分“b”(A)和“c”(B)的质谱图

Fig. 3 Mass spectra of pheromone gland components “b” (A) and “c” (B) of *Dendrolimus houi*

GC-EAD 分析发现 SPME 萃取的云南松毛虫性信息素腺体挥发性成分中有 3 个成分具有 EAD 活性(图 4)。其中腺体成分“1”的 Kováts 保留指数是 1 887，与图 2 中的腺体成分“a”的保留指数相同，证明该成分是 *E*5，*Z*7-12∶Ald。同理，具有电生理活性的腺体成分“2”和“3”的 Kováts 保留指数分别是 2 061 和 2 156，证明这 2 种 EAD 活性成分是 *E*5，*Z*7-12∶OAc 和 *E*5，*Z*7-12∶OH(图 4)。标准品的触角电位活性研究表明，云南松毛虫雄虫触角除了对 *E*5，*Z*7-12∶Ald，*E*5，*Z*7-12∶OAc 和 *E*5，*Z*7-12∶OH 3 种成分有 EAD 反应外，还对顺 5，反 7-立体异构体的醇、醛和乙酸酯成分有 EAD 反应(图 5)。

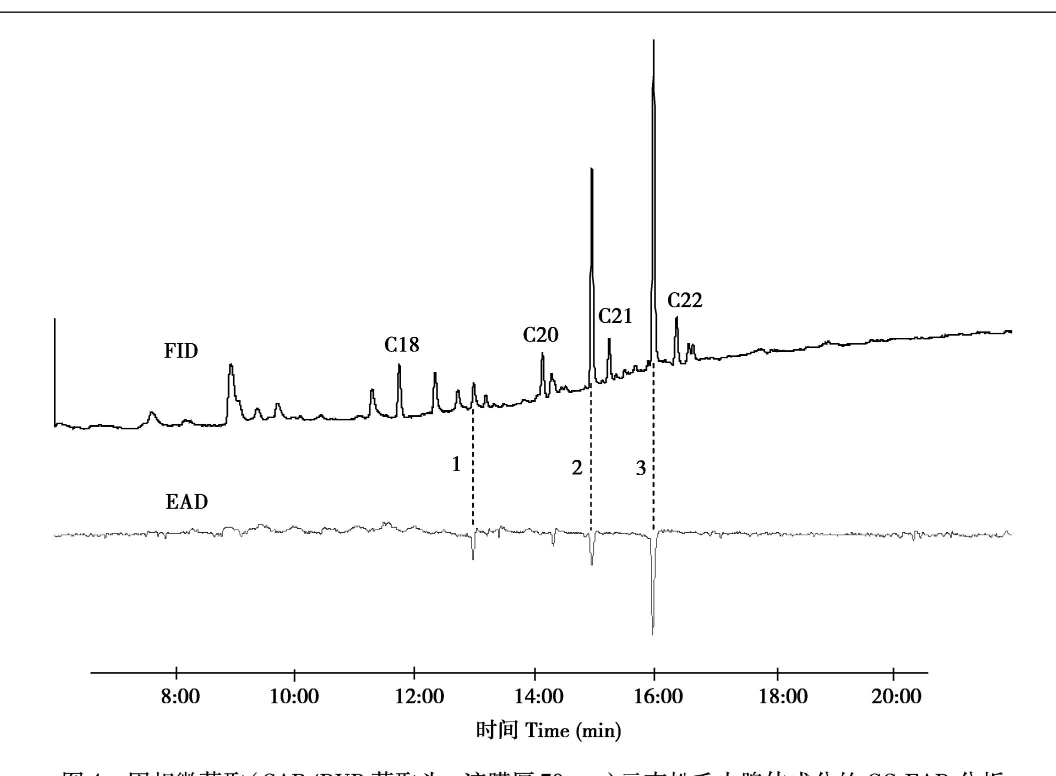


图 4　固相微萃取(CAR/DVB 萃取头，液膜厚 70 μm)云南松毛虫腺体成分的 GC-EAD 分析

Fig. 4　GC-EAD recordings of male antennae of *Dendrolimus houi* to its female-derived pheromone effluvia with SPME CAR/DVB fiber (70 μm) sampling technique

1：反 5，顺 7-十二碳二烯醛 *E*5，*Z*7-12:Ald；2：反 5，顺 7-十二碳二烯乙酸酯 *E*5，*Z*7-12:OAc；3：反 5，顺 7-十二碳二烯醇 *E*5，*Z*7-12:OH.

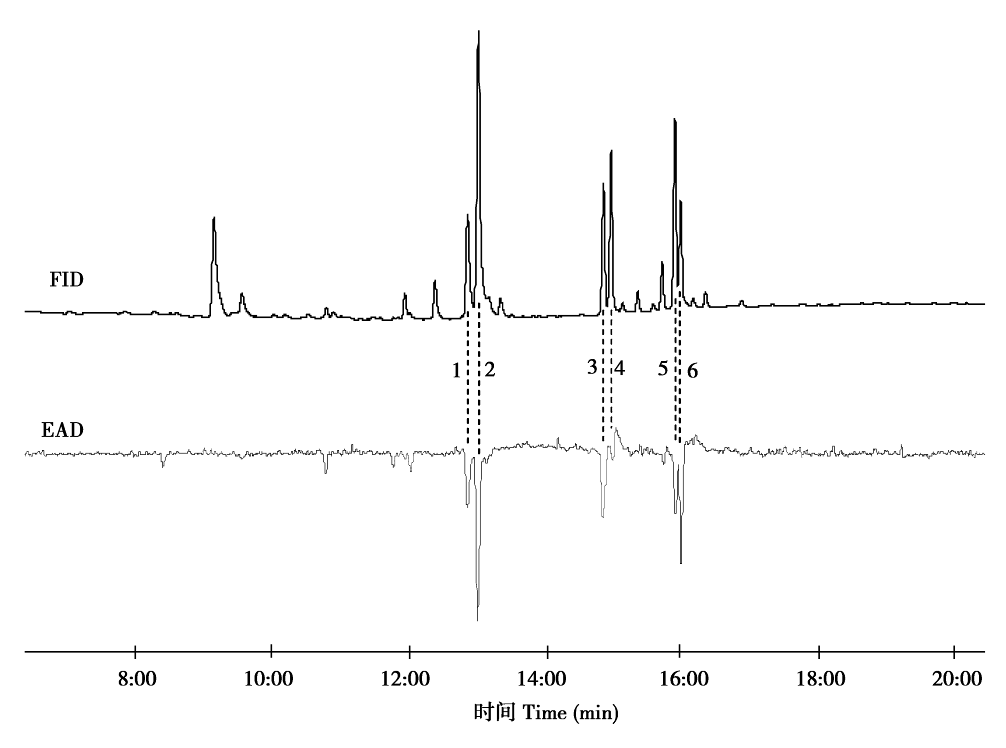


图 5　云南松毛虫雄虫触角对松毛虫性信息素标准品的 GC-EAD 分析

Fig. 5　GC-EAD recordings of male antennae of *Dendrolimus houi* to synthetic compounds of pheromone candidates

1：顺 5，反 7-十二碳二烯醛 *Z*5，*E*7-12:Ald；2：反 5，顺 7-十二碳二烯醛 *E*5，*Z*7-12:Ald；3：顺 5，反 7-十二碳二烯乙酸酯 *Z*5，*E*7-12:OAc；4：反 5，顺 7-十二碳二烯乙酸酯 *E*5，*Z*7-12:OAc；5：顺 5，反 7-十二碳二烯醇 *Z*5，*E*7-12:OH；6：反 5，顺 7-十二碳二烯醇 *E*5，*Z*7-12:OH.

3 讨论

溶剂浸提云南松毛虫性信息素腺体成分发现单头雌蛾释放 *E*5, *Z*7-12:OH、*E*5, *Z*7-12:OAc 和 *E*5, *Z*7-12:Ald 的量分别是 14.7 ± 12.9 ng（n = 21; ± *SD*）, 5.8 ± 5.4 ng 和 0.8 ± 1.4 ng（Kong *et al*., 2007a）。由于云南松毛虫活雌蛾能持续 5 ~ 6 h 处在求偶召唤状态, SPME 萃取头长时间近距离（1 ~ 2 mm）顶空采集单头活雌蛾释放的性信息素成分, 主要性信息素成分 *E*5, *Z*7-12:OH 和 *E*5, *Z*7-12:OAc 的量都大于溶剂浸提的量, 完全能满足质谱分析的需要。溶剂浸提和 SPME 萃取的微量成分 *E*5, *Z*7-12:Ald 都受到杂质干扰而未获得清晰的质谱图, 但是 2 种方法提取的 *E*5, *Z*7-12:Ald 的质谱图都具有其特征碎片离子。SPME-GC-EAD 分析时, 次要成分 *E*5, *Z*7-12:Ald 的 EAD 反应强度明显大于溶剂浸提的 *E*5, *Z*7-12:Ald 激起的 EAD 反应（Kong *et al*., 2007a）。SPME 萃取单头处女活雌蛾释放的性信息素成分与溶剂浸提性信息素成分比较分析时, SPME 具有采集的性信息素成分受杂质干扰少, 降低样品预处理的工作量, 采集的成分是自然条件下雄虫感知最灵敏的组分等方面的优点, 所以 SPME 采集的性信息素组分更具有代表性。

固相微萃取云南松毛虫性信息素腺体成分时发现 CAR/DVB 萃取头的萃取效果明显优于聚丙烯酸酯（PA）和聚二甲硅氧烷（PDMS）萃取头, 所以针对分析化合物的性质选择适宜的萃取头是非常重要的。萃取头在 GC 进样器中热解析 2 min 就能将 97% 的信息素成分解析下来。利用热解析过的萃取头再进行 GC-EAD 分析时, 第一次分析残余的主要性信息素成分仍能激起 EAD 反应。所以建议 SPME 萃取头使用前在 220℃ 进样器中老化 10 ~ 15 min, 以避免其他杂质的干扰。样品吸附量与吸附时间成正比, 直到萃取过程达到动态平衡。但是, SPME 萃取的性信息素成分并不严格代表腺体周围各成分的真实比例, 用标准品对不同极性的萃取头进行校准是非常必要的。定性分析时, 萃取时间的长短可根据萃取物的性质和浓度大小决定; 定量分析时, 需要在特定温度条件下用适当的标准品校准不同萃取头的吸附能力和吸附时间。多成分样品分析时, 由于存在不同成分对吸附位点的竞争而不应采用单一标准品对萃取涂层的吸附能力进行校准（Murray, 2001）。但是可以通过降低萃取时间, 在不同成分达到平衡时间之前停止萃取来避免不同成分间对吸附位点的竞争（Song *et al*., 1997）。

SPME 具有直接浸提和顶空萃取 2 种采样方法, 其萃取和热解析效率的高低受多种因素的影响。顶空萃取时, 萃取头的极性、液膜厚度、温度、萃取时间和萃取物浓度等因素影响萃取效率（Wardencki *et al*., 2004; Cuevas-Glory *et al*., 2007; Stashenko *et al*., 2007）; 而直接浸提萃取时, 搅拌、盐析、pH 值和温度都会影响萃取头的萃取效率（Kataoka *et al*., 2000）。热解析时又受萃取物的挥发性、萃取头的液膜厚度、进样深度、热解析温度和时间等因素的影响（Cuevas-Glory *et al*., 2007）。所以在利用 SPME 进行样品采集分析时, 应该综合考虑各种因素的影响, 以达到最佳的分析效果。

致谢 松毛虫性信息素固相微萃取过程简图由张培毅高级工程师绘制, 在此表示衷心感谢。

参 考 文 献（References）

Cuevas-Glory LF, Pino JA, Santiago LS, Sauri-Duch E, 2007. A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. *Food Chem*., 103: 1032 – 1043.

Kataoka H, Lord HL, Pawliszyn J, 2000. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr*., 880: 35 – 62.

Kong XB, Zhang Z, Wang HB, Yang J, Hu YT, 2005a. Analysis of *Platycladus orientalis* voaltiles and their electroantennogram responses with *Semanotus bifasciatus*. *Forest Res*., 18(3): 260 – 266. [孔祥波, 张真, 王鸿斌, 杨杰, 胡玉田, 2005a. 侧柏挥发性化学成分的鉴定及其对双条杉天牛的触角电位反应. 林业科学研究, 18(3): 260 – 266]

Kong XB, Zhang Z, Wang HB, Zhao CH, 2005b. Study on trace component in sex pheromones of *Dendrolimus* spp. *Chin. J. Chromatogr*., 23(4): 370 – 373. [孔祥波, 张真, 王鸿斌, 赵成华, 2005b. 松毛虫性信息素微量成分鉴定方法的研究. 色谱, 23(4): 370 – 373]

Kong XB, Zhang Z, Zhao CH, Wang HB, 2007a. Female sex pheromone of the Yunnan pine caterpillar moth *Dendrolimus houi*: first (*E*, *Z*)-isomers in pheromone components of *Dendrolimus* spp. *J. Chem. Ecol*., 33: 1316 – 1327.

Kong XB, Zhao CH, Wang R, 2007b. Sex pheromone of the larch caterpillar moth, *Dendrolimus superans*, from northeastern China. *Entomol. Exp. Appl*., 124: 37 – 44.

Kong XB, Zhao CH, Zhang Z, Wang HB, 2004. Determination of double bond position in conjugated dienes in sex pheromones of *Dendrolimus* spp. *Chin. J. Chromatogr*., 22(2): 97 – 100. [孔祥波, 赵成华, 张真, 王鸿斌, 2004. 松毛虫性信息素共轭双键定位方法的研究. 色谱, 22(2): 97 – 100]

Mallose C, Ramirez-Lucas P, Rochat D, Morin JP, 1995. Solid-phase microextraction, an alternative method for the study of airborne insect

pheromones (*Metamasius hemipterus*, Coleoptera, Curculionidae). *J. High Resol. Chromatogr.*, 18: 669–670.

Marques FA, McElfresh JS, Millar JG, 2000. Kovǘts retention indexes of monounsaturated C_{12}, C_{14}, and C_{16} alcohols, acetates and aldehydes commonly found in Lepidopteran pheromone blends. *J. Braz. Chem. Soc.*, 11(6): 592–599.

Murray RA, 2001. Limitations to the use of solid-phase microextraction for quantitation of mixtures of volatile organic sulfur compounds. *Anal. Chem.*, 73: 1646–1649.

Robacker DC, Aluja M, Bartelt RJ, Patt J, 2009. Identification of chemicals emitted by calling males of the sapote fruit fly, *Anastrepha serpentine*. *J. Chem. Ecol.*, 35: 601–609.

Song J, Gardner BD, Holland JF, Beaudry RM, 1997. Rapid analysis of volatile flavor compounds in apple fruit using SPME and GC/time-of-flight mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 1801–1807.

Stashenko EE, Martínez JR, 2007. Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 70: 235–242.

Wardencki W, Michulec M, Curylo J, 2004. A review of theoretical and practical aspects of solid phase microextraction in food analysis. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 39: 703–717.

（责任编辑：赵利辉）